基础研究

Hsp90 抑制剂槚如酸对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭、迁移的影响

李红梅,聂丽娟,霍 强,赵素容,马 涛,吴成柱,刘 浩
蚌埠医学院药学系,安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探讨热休克蛋白90 (Hsp90) 抑制剂槚如酸对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、侵袭、迁移的影响。**方法** 采用体外malachite green-molybdate显色反应和ATP-琼脂糖凝胶结合实验检测槚如酸对Hsp90抑制活性;MTT法检测药物对MDA-MB-231增殖抑制效应;Transwell小室法检测药物对细胞侵袭和迁移影响;免疫印迹法检测药物对相关蛋白基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)、Hsp90、热休克蛋白70(Hsp70)表达的影响。**结果** 槚如酸为特异性的Hsp90抑制剂,其抑制IC_{50}值为82.5 μmol/L。MTT结果显示,槚如酸具有明显抑制细胞增殖的作用,且呈现浓度依赖关系,其IC_{50}值为29.3 μmol/L。不同浓度的槚如酸(12.5,25.0,50.0 μmol/L)处理36 h后,与对照组相比,药物对细胞侵袭抑制率分别为:23.6%、56.6%、67.0%,P<0.05。槚如酸(12.5,25.0,50.0 μmol/L)处理24 h后,与对照组相比,药物对细胞迁移抑制率分别为:30.0%、45.5%、77.5%,P<0.05。免疫印迹法结果显示,槚如酸随着浓度的增加,诱导MMP-9降解越明显,而对Hsp90和Hsp70蛋白表达均没有影响。**结论** 槚如酸能明显抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移能力,其机制可能是通过抑制Hsp90 ATPase活性以及导致下游的顾客蛋白的MMP-9表达下调有关。

关键词:槚如酸;热休克蛋白90;三阴性乳腺癌;抗肿瘤活性

Effect of anacardic acid, a Hsp90 inhibitor, on proliferation, invasion and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells

LI Hongmei, NIE Lijuan, HUO Qiang, ZHAO Surong, MA Tao, WU Chengzhu, LIU Hao
Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To explore the effect of the Hsp90 inhibitor anacardic acid on cell proliferation, invasion and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** The inhibitory effect of anacardic acid on Hsp90 was assessed with *in vitro* ATPase inhibition assay and ATP-sepharose binding assay. MTT assay was used to detect the growth inhibition induced by anacardic acid in MDA-MB-231 cells. Transwell assays were used to evaluate MDA-MB-231 cell invasion and migration. Western blotting was performed to assess the effect of anacardic acid in triggering the degradation of MMP-9, TIMP-1, Hsp90, and Hsp70. **Results** Anacardic acid exhibited a modest activity of ATPase inhibition with an IC_{50} value of 82.5 μmol/L. Anacardic acid significantly suppressed the proliferation of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner (IC_{50} value of 29.3 μmol/L). Treatment with 12.5, 25, and 50 μmol/L anacardic acid for 36 h caused inhibition of cell invasion by 23.6%, 56.6%, and 67.0% in MDA-MB-231 cells, respectively (P<0.05), and anacardic acid treatment for 24 h inhibited the cell migration by 30.0%, 45.5%, and 77.5%, respectively (P<0.05). Anacardic acid dose-dependently induced MMP-9 degradation, but did not obviously affect Hsp90 or Hsp70 expressions. **Conclusion** Anacardic acid can significantly inhibit the proliferation, invasion, and migration of MDA-MB-231 cells, the mechanism of which may involve the inhibition of Hsp90 ATPse activity and down-regulation of MMP-9 expression.

Key words: anacardic acid; Hsp90; triple negative breast cancer; anti-tumor activity

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,严重危害着女性的健康,其中三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)具有发病年龄轻、易复发、易转移、预后差等病理及临床特征而引起了越来越多的关注。三阴性乳腺癌系指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体(Her-2)表达均为阴性的乳腺癌[1]。热休克蛋白90(heat shock protein 90, Hsp90)作为分子伴侣蛋白调节众多信号蛋白的构象成熟和稳定性,在细胞生长、分化、凋亡以及肿瘤的发展中发挥着重要作用,逐渐成为了目前抗肿瘤药物研究中重要的靶点之一[2-3]。槚如酸具有水杨酸母核结构,广泛存在于漆树科植物,特别是槚如树(*Anacardium occidentale*)的果实和银杏(*Ginkgo biloba*)的叶中,具有抗肿瘤、抗菌、基因表达调

收稿日期:2014-08-22
基金项目:国家自然科学基金(81302671,81372899);安徽省自然科学基金(1408085QH162);蚌埠医学院科研基金(Bykf1326)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81302671, 81372899).
作者简介:李红梅,助教,电话:0552-3171262, E-mail: athongmei@foxmail.com
通信作者:刘 浩,教授,电话:0552-3175230, E-mail: liuhao6886@foxmail.com;吴成柱,博士,电话:0552-3150182,E-mail: wuchengzhu0611@foxmail.com

节、杀虫等广泛的生物活性[4]。研究表明,槚如酸虽然对多种肿瘤细胞具有良好的体外、体内的抗肿瘤作用,但其抗肿瘤作用机制的报道较少[5-7]。本研究以不同浓度的槚如酸作用于三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞,探讨槚如酸对Hsp90活性,肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移的影响,为今后的持续研究提供实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *Hsp90重组蛋白* 克隆酵母Hsp90全基因,在pET-28a高效表达质粒中IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside)诱导表达,得到Hsp90-tis融合蛋白。再经6x Histidine sepharose CL-6B亲和层析柱进行纯化,可得到纯度90%以上的Hsp90-his融合蛋白[8]。

1.1.2 *细胞株及细胞培养* 人乳腺癌MDA-MB-231细胞株,购于中科院上海细胞库。MDA-MB-231细胞复苏后,于DMEM培养液(含10%胎牛血清,3.7 g/l碳酸氢钠,1×10^5 IU/l青霉素,100 mg/l链霉素),置37 ℃、饱和湿度、5% CO_2培养箱中培养,0.25%胰酶消化后传代培养。

1.1.3 *主要试剂* DMEM培养液、胰蛋白酶:Gibco公司;胎牛血清:浙江四季青公司;二甲基亚砜(DMSO):Sigma公司;Transwell小室:Corning公司;Matrigel基质蛋白:BD公司;兔抗人MMP-9,兔抗人TIMP-1:武汉博士德生物工程公司;鼠抗人β-actin、鼠抗人Hsp70:Santacruz公司;山羊抗人Hsp90α:Stressgen公司;Anacardic acid:Santacruz公司(sc-202463)。

1.2 方法

1.2.1 *体外检测Hsp90 ATPase活性实验* Hsp90的ATPase活性检测采用malachite green-molybdat显色反应。将高纯度的Hsp90-his融合蛋白2 μmol/L置于96孔板中,每个孔加入不同浓度的槚如酸和反应缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L KCl, 6 mmol/L $MgCl_2$,pH 7.4)混匀后置37 ℃反应2.5 h,每个药物浓度设三个复孔。反应结束后加入80 μl malachite green-molybdate溶液显色,并在波长620 nm测每个孔的吸光度(A)值,并计算出槚如酸对Hsp90的ATPase抑制活性。以上实验重复3次[8]。

1.2.2 *ATP-琼脂糖凝胶与Hsp90α结合能力实验* 向含有Hsp90α蛋白1 μg的反应缓冲液100 μl中各加入不同浓度的槚如酸(0,20,200,2000 nmol/L),并置于冰中反应。反应30 min后,各反应液加入C10-偶联氨基苯ATP-琼脂糖凝胶50 μl,混匀后置4 ℃继续反应3 h。孵育后,对ATP-琼脂糖凝胶株进行依次洗脱,各洗脱液再经免疫印迹法分析不同浓度药物处理组的Hsp90抗体表达[8]。

1.2.3 *MTT法* 取对数生长期的乳腺癌MDA-MB-231细胞,用0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔100 μl培养液中含有5000个细胞,于5% CO_2饱和湿度37 ℃培养箱中培养。培养24 h后,按不同浓度处理槚如酸,同时设阳性对照组和空白对照组,每个处理3个复孔,继续培养48 h后每孔加入10 μl浓度为5 g/l的MTT溶液继续孵育4 h,弃去培养液,每孔加入DMSO 150 μl,37 ℃孵育30 min,微量振荡器振荡10 min使结晶物充分溶解,用酶标仪在570 nm波长下检测每孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率:细胞存活率/% =实验组A570 nm/对照组A570 nm×100%,绘制剂量效应曲线,采用Logit法计算半数抑制浓度(IC_{50})。以上实验重复3次。

1.2.4 *Transwell体外迁移实验* 取对数生长期MDA-MB-231细胞,消化离心,用不同浓度槚如酸的无血清培养基稀释细胞至5×10^5/ml,每个Transwell小室中加入100 μl,下室每孔加入含5%胎牛血清的DMEM高糖培养基600 μl,培养24 h后取出小室,用棉签擦去小室上层未迁移的细胞,4%多聚甲醛室温固定15 min,0.1%结晶紫染色15 min,各取5个400×视野显微镜下观察拍照。迁移抑制率/%=(1-实验组迁移细胞数/对照组迁移细胞数)×100%。

1.2.5 *Transwell体外侵袭实验* 每个Transwell小室的聚碳酸酯微孔膜铺50 μl Matrigel基质蛋白,用不同浓度槚如酸处理36 h,其余操作同细胞迁移实验。侵袭抑制率/%=(1-实验组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数)×100%。

1.2.6 *免疫印迹法* 调细胞浓度为2×10^5/ml接种于6孔板,2 ml/孔,24 h后开始给药。冰PBS清洗后,滤纸吸干液体后加入细胞裂解液,200 μl /孔,置冰上30 min,细胞刮下,转移至EP管内80 ℃冻存,经3次反复冻融后BCA法定量,调蛋白浓度后加上样缓冲液煮沸10 min。SDS-PAGE后转移至PVDF膜,封闭过夜后,置相关蛋白的一抗、二抗,显色分析。

1.2.7 *统计学处理* 实验数据以均数±标准差表示,采用SPSS13.0软件对数据进行单因素方差分析,各组间比较用双侧Dunnett t检验。当$P<0.05$时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槚如酸体外对Hsp90 ATPase活性的影响

本研究通过筛选Hsp90 ATPase活性的体外酶反应方法,发现水杨酸类化合物槚如酸具有特异性地抑制酵母Hsp90重组蛋白的ATPase活性作用。槚如酸抑制Hsp90 ATPase活性的IC_{50}值为82.5 μmol/L,而最典型的Hsp90抑制剂格尔德霉素(GA)的IC_{50}值为3.1 μmol/L(表1)。另外,ATP-琼脂糖凝胶与Hsp90α结合能力实验验证了槚如酸是通过和ATP竞争性地,与Hsp90蛋白的N-末端ATP结合域结合,而显示出抑制Hsp90 ATPase活性。图1显示,槚如酸阻碍Hsp90α蛋白与ATP-琼脂糖凝胶株结合,其结合抑制能力呈现出浓度依赖性,并

且不同浓度槚如酸与DMSO给药组比较具有显著的抑制效果。

表1 格尔德霉素和槚如酸生物活性的比较

Tab.1 Comparison of biological activities of geldanamcyin and anacardic acid (*Mean±SD, μmol/L*)

	Yeast Hsp90 ATPase inhibition assay (IC_{50})	Cell viability assay (IC_{50}) MDA-MB-231
Geldanamycin	3.1±0.2	0.31±0.02
Anacardic acid	82.5±2.6	29.3±0.6

2.2 槚如酸对MDA-MB-231细胞增殖的影响

MTT法测定结果显示，与对照组相比，不同浓度的槚如酸(0, 12.5, 25, 50, 75, 100 μmol/L)处理乳腺癌MDA-MB-231细胞48 h后均有显著的细胞增殖抑制作用。MDA-MB-231细胞增殖随着槚如酸药物的浓度增加，其抑制作用越明显，IC_{50}值为29.3 μmol/L，且呈现浓度依赖性关系(表1)。

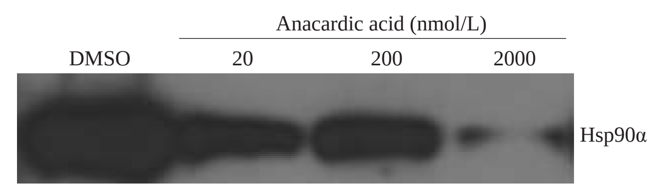


图1 槚如酸的竞争性地结合能力

Fig.1 Competitive binding assay for anacardic acid.

2.3 槚如酸可抑制MDA-MB-231细胞的侵袭、迁移能力

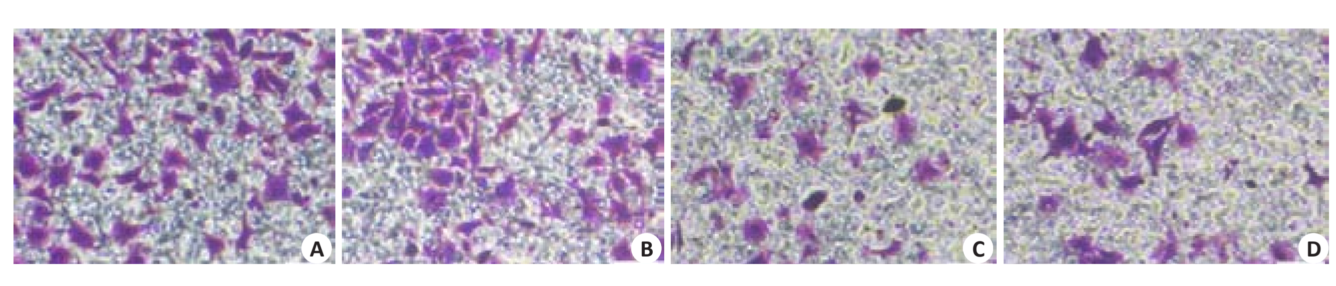
通过体外Transwell小室法研究发现，不同浓度的槚如酸处理乳腺癌MDA-MB-231细胞36 h后，其MDA-MB-231细胞侵袭能力明显减弱。与对照组相比，给药组(12.5, 25, 50 μmol/L)的侵袭抑制率分别为：23.6%、56.6%、67.0%(P<0.05，图2)。槚如酸具有明显降低MDA-MB-231细胞的侵袭能力，并呈现出一定的浓度依赖性。此外，体外Transwell迁移实验研究发现，槚如酸处理乳腺癌MDA-MB-231细胞24 h后，与对照组相比，给药组(12.5, 25, 50 μmol/L)的迁移抑制率分别为:30.0%、45.5%、77.5%(P<0.05，图3)。

2.4 槚如酸对相关蛋白表达的影响

不同浓度的槚如酸(0, 25, 50, 100 μmol/L)处理乳腺癌MDA-MB-231细胞24 h后，通过免疫印迹法观察了相关蛋白MMP-9、TIMP-1、Hsp90、Hsp70的表达情况。如图4所示，Hsp90顾客蛋白之一，MMP-9随着药物浓度的增加，其表达依次下调，呈现出一定的浓度依赖关系。与对照组相比，给药组(25, 50, 100 μmol/L)的表达下调率分别为：3%、27%、36%，P<0.05 。而TIMP-1表达随着药物浓度的增加，其表达逐渐上调，呈现出一定的浓度依赖关系。与对照组相比，给药组(25, 50, 100 μmol/L)的表达下调率分别为：8%、44%、45%(P<0.05，图4)。槚如酸作为一个小分子的Hsp90抑制剂，虽然具有显著的抑制Hsp90 ATPase活性，但对Hsp90和Hsp70表达均不产生明显的影响(图5)。

3 讨论

Hsp90在肿瘤发生、发展的众多信号通路中起作用：包括生长与生长抑制的调控；逃避凋亡；无限制地复制；肿瘤转移和组织浸润；维持血管生成等。TNBC患者约占乳腺癌患者的15%，具有易复发、易转移等特征，并对抗Her-2的靶向药物赫赛汀及内分泌药物治疗均不敏感，目前缺乏对TNBC的规范化药物治疗指南。Hsp90在肿瘤细胞中表达比正常细胞高出2~10倍，因此Hsp90抑制剂对肿瘤细胞具有特定的选择性抗肿瘤作用[9]。最近研究表明，Hsp90抑制剂如PF-4942847、PU-71在体外体内均显示良好的抗TNBC作用，并且Ganetespib(STA-9090)已处于治疗TNBC的临床II期试验。这些研究提示Hsp90抑制剂用于治疗TNBC具



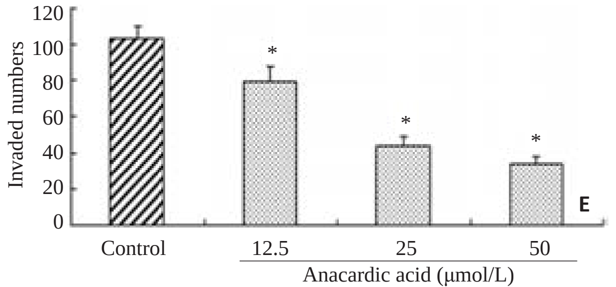
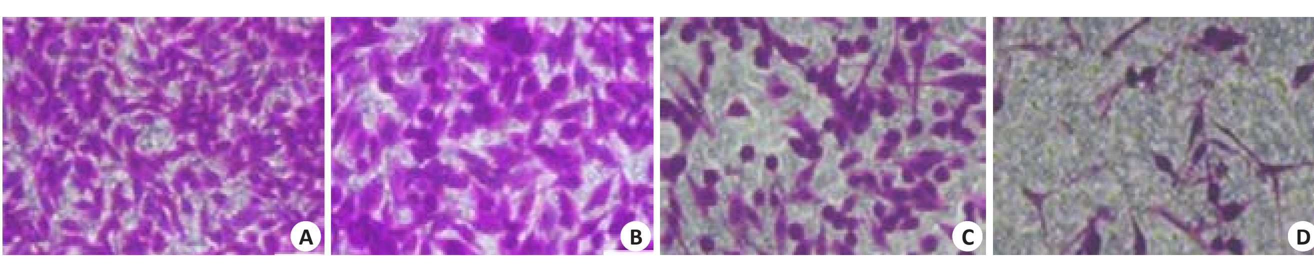


图2 槚如酸对MDA-MB-231细胞侵袭能力的抑制

Fig.2 Anacardic acid suppressed the invasion of MDA-MB-231 cells (Original magnification: ×400). ***A***: 0 μmol/L; ***B***: 12.5 μmol/L; ***C***: 25 μmol/L; ***D***: 50 μmol/L; ***E***: Quantitative analysis of MDA-MB-231 cell invasion after anacardic acid treatment. *P<0.05 *vs* control.



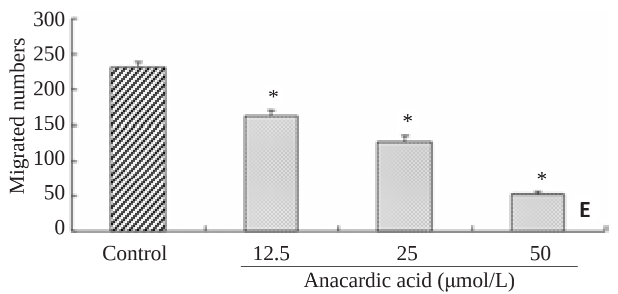
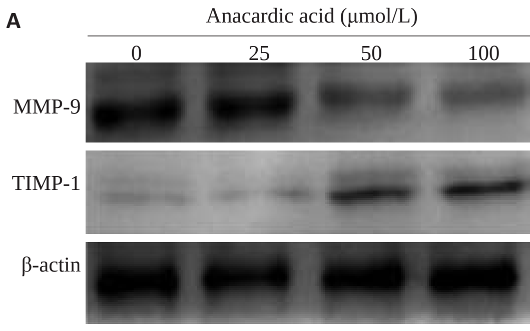
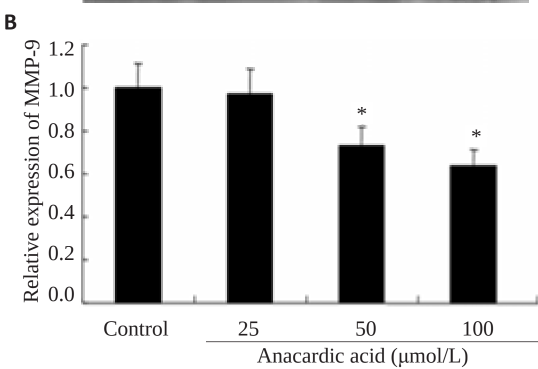


图3 槚如酸对MDA-MB-231细胞迁移能力的抑制

Fig.3 Anacardic acid suppressed the migration of MDA-MB-231 cells (Original magnification: ×400). *A*: 0 μmol/L; *B*: 12.5 μmol/L; *C*: 25 μmol/L; *D*: 50 μmol/L; *E*: Quantitative analysis of MDA-MB-231 cell migration after anacardic acid treatment. **P*<0.05 *vs* control.





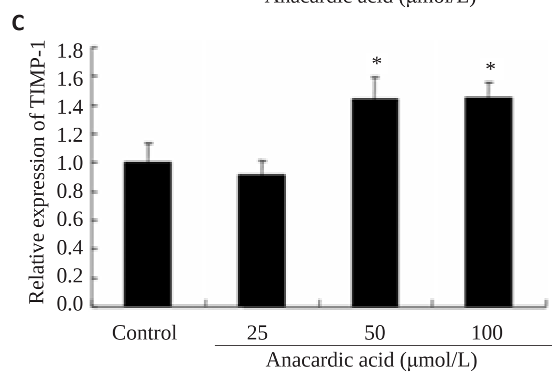
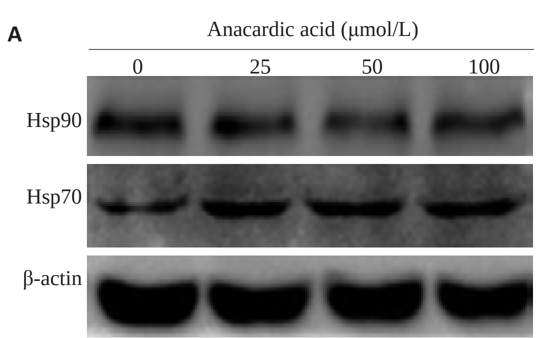
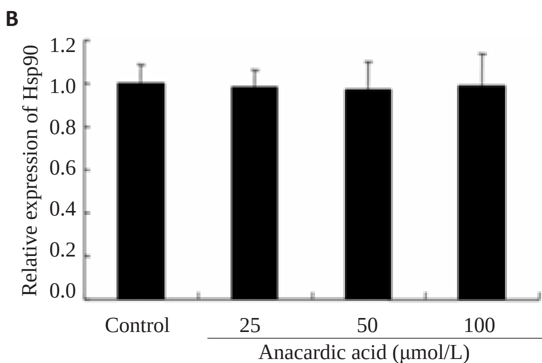


图4 槚如酸对MMP-9和TIMP-1蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of anacardic acid on expression of MMP-9 and TIMP-1. *A*: Expression of MMP-9 and TIMP-1 proteins detected by Western blotting; *B*, *C*: Quantitative analysis of MMP-9 and TIMP-1 expressions in MDA-MB-231 cells. **P*<0.05 *vs* control.





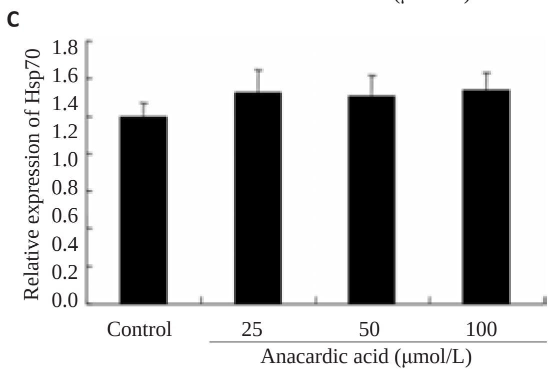


图5 槚如酸对Hsp90和Hsp70蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of anacardic acid on expression of Hsp90 and Hsp70. *A*: Expression of Hsp90 and Hsp70 proteins detected by Western blotting. *B*, *C*: Quantitative analysis of the results of Western blotting.

有良好的应用前景[10-12]。

天然产物一直是新药研发中,发现先导化合物的重要来源之一。本研究通过对实验室拥有的天然化合物进行体外抑制Hsp90 ATPase活性筛选,发现槚如酸具有特异性抑制Hsp90 ATPase活性作用。槚如酸结构上属于水杨酸类衍生物,是典型的histone acetyltransferase抑制剂,并通过抗生长、诱导凋亡等产生抗肿瘤作用[13]。本实验结果显示,槚如酸具有抑制Hsp90 ATPase活性、抑制肿瘤细胞增殖以及侵袭转移的能力。该研究结果对寻找TNBC治疗药物过程中,发现先导化合物具有重要的指导意义。

Hsp90蛋白N-末端有一个高度保守的ATP结合位点,Hsp90发挥分子伴侣功能的作用机制包括ATP结合到N-末端结构域及随后的ATP水解。大多数Hsp90抑制剂,如GA是通过和ATP竞争性地与N-末端结合,继而通过泛素化蛋白酶体途径降解众多肿瘤相关顾客蛋白。本研究采用了2种体外方法来检测槚如酸的抑制Hsp90活性,结果证明槚如酸对酵母Hsp90 ATPase活性具有特异性的抑制作用,且可能是槚如酸与ATP竞争性地结合于Hsp90的N-末端ATP结合位点。图1显示随着槚如酸浓度的增加,与ATP-琼脂糖凝胶结合的Hsp90α的量明显下降,即说明槚如酸阻碍Hsp90与ATP的结合。

乳腺癌是全身性恶性肿瘤,转移是乳腺癌患者死亡的重要原因,而细胞外基质(ECM)和基底膜的降解是癌细胞侵袭转移过程中的一个关键步骤。本实验通过Transwell体外侵袭迁移模型模拟在体TNBC肿瘤细胞的侵袭迁移过程,结果显示Hsp90抑制剂槚如酸可有效地抑制MDA-MB-231细胞的侵袭迁移能力,随着药物浓度的增加其抑制效果越明显,即槚如酸对肿瘤细胞的抑制作用呈现剂量-效应关系。据报道,乳腺癌单克隆抗体4C5通过抑制Hsp90与MMP2、MMP9相互作用显著地抑制乳腺癌的骨转移[14]。Hsp90顾客蛋白之一的MMP9是MMPs中的相对分子量最大的,参与ECM的IV型、V型胶原和明胶的降解,在肿瘤的血管形成、浸润和转移过程中扮演关键角色[15]。乳腺癌的转移是多步骤多因素参与的复杂过程,本研究结果显示,在这过程中MMP-9和TIMP-1发挥着重要作用。槚如酸对乳腺癌MDA-MB-231细胞侵袭迁移能力具有显著的抑制作用,其可能机制是通过抑制Hsp90的分子伴侣功能下调MMP-9蛋白表达,同时增加肿瘤细胞自身可产生的TIMP-1的表达增加相关。有趣的是在整个过程中槚如酸对细胞内Hsp90和Hsp70蛋白表达均没有影响,即槚如酸只是抑制Hsp90 ATPase活性,对其蛋白表达均不起作用,与以往的文献报道大致吻合。

综上所述,槚如酸作为一个小分子的新型Hsp90抑制剂,具有较强的体外抗TNBC作用,即抑制Hsp90 ATPase活性,抑制肿瘤 增殖、侵袭、迁移。遗憾的是本研究中仅采用了体外检测方法来探讨了槚如酸的抗TNBC作用,因此进一步的体内外药效及其作用机制研究有待于深入。

参考文献:

[1] Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer[J]. Mod Pathol, 2006, 19(5): 617-21.

[2] Whitesell L, Lindquist SL. Hsp90 and the charperoning of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 761-72.

[3] Sankhala KK, Mita MM, Mita AC. Heat shock proteins: a potential anticancer target[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(14): 2001-8.

[4] Seijas JA, Vázouez-Tatomp MP, Martinez MM, et al. Synthesis of anacardic acids by nucleophilis substitution on 2-aryloxazolines[J]. Tetrahedron Lett, 2004, 45(9): 1937-9.

[5] Rea AI, Schmidt JM, Setzer WN, et al. Cytotoxic activity of Ozorpa insignis from Zimbabwe[J]. Fitoterapia, 2003, 74(7-8): 732-35.

[6] Kubo I, Ochi M, Vieira PC, et al. Antitumor agents from the Cashew (Anacardium occidentale) apple juice [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1012-015.

[7] Schultz DJ, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, et al. Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(3): 594-605.

[8] Wu CZ, Moon AN, Choi O, et al. 6-Alkylsalicylic acid analogues inhibit in vitro ATPase activity of heat shock protein 90[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(12): 1997-2001.

[9] Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A hig-affinity conformation of Hsp90 confers tumor selectivity on Hsp90 inhibitors[J]. Nature, 2003, 425(6956): 407-10.

[10] Mehta PP, Whalen P, Baxi SM, et al. Effective targeting of triple-negative breast cancer cells by PF-4942847, a novel oral inhibitor of Hsp90[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(16): 5432-42.

[11] Caldas-Lopes E, Cerchietti L, Ahn JH, et al. Hsp90 inhibitor PU-71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models [J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106(20): 8368-73.

[12] Shastry M, Yardley D. Updates in the treatment of basal/triple-negative breast cnacer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2013, 25(1): 40-8.

[13] Sun YL, Jiang XF, Chen SJ, et al. Inhibition of histone acetyl-transferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation[J]. FEBS Lett, 2006, 580(18): 4353-6.

[14] Stellas D, Hamidieh A, Patsavaudi E. Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracelluar Hsp90 and inhibits formation of meta-static breast cancer cell deposits[J]. BMC Cell Biol, 2010, 11: 15.

[15] Groblewska M, Siewko M, Mcrozko B, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012, 50(1): 12-9.

(编辑:吴锦雅)